

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Mükoloogia õppetool

Anna-Liisa Kuusmik

SAMBLIKUPOPULATSIOONIDE GENEETILINE VARIEERUVUS

Bakalaureusetöö

Juhendaja: dotsent Tiina Randlane

Tartu 2014

Sisukord

1. Sissejuhatus	3
2. Samblike geneetilise mitmekesisuse uurimismeetodid	4
2.1. Taust	4
2.2. Varajased uuringud samblikuainete abil.....	4
2.3. Universaalsete sõrmejälgede meetodid (<i>universal fingerprints techniques</i>).....	5
2.3.1. RAPD ja AFLP	5
2.3.2. Teisi meetodeid polümorfismi uurimiseks	7
2.4. Eri lookuste sekveneerimine.....	8
2.5. Mikrosatelliidid	9
3. Samblike geneetilist mitmekesisust mõjutavad tegurid hariliku kopsusambliku (<i>Lobaria pulmonaria</i>) näitel	11
3.1. Häiringud	11
3.2. Fragmenteerumine	13
3.3. Kasvupaiga kvaliteet.....	16
4. Geneetilise mitmekesisuse kasutamine samblike fülogeograafilistes uuringutes	21
5. Arutelu	26
Kokkuvõte	30
Summary.....	31
Tänuõnad.....	32
Kasutatud kirjandus	32

1. Sissejuhatus

Geneetiline mitmekesisus on üks kolmest elurikkuse vormist koosluste ja liikide mitmekesisuse kõrval, kuid on seni vähim uuritud. Liikide kadumine on kergesti märgatav muutus ja sellele pööratakse laialdast tähelepanu. Samas on geenide varieeruvuse vähenemine samuti väga ohtlik, kuna sellega koos väheneb populatsioonide ja liikide võime kohastuda käimasolevate keskkonnamuutustega.

Populatsioonigeneetika ülesandeks on uurida looduslike populatsioonide geenimustreid, seletada geenimustri kujunemisel osalenud protsesse, põhjusi ja sellest tulenevat mõju populatsiooni edasisele elumusele (Werth 2010). Hiljutised arengud populatsioonigeneetika valdkonnas, kus morfoloogilisi ja allosüümidel põhinevaid meetodeid kasutada ei saa, viitavad molekulaarsete meetodite üha laialdasemale kasutuselevõtule (James & Ashburner 1997).

Samblikud on oluline osa elurikkusest, mis asustavad erinevate keskkonnatingimustega elupaiku üle maakera. Samblikud on liitorganismid, mis koosnevad kahest sümbiondist – peamiselt seenest ja vähemalt ühest fotobiondist, rohevetikast või tsüanobakterist (Randlane & Saag 2004). Eri päritolu osapoolte esinemine samblikutalluses tähendab ka erisuguse geneetilise materjali olemasolu, mis muudab samblike populatsioonigeneetilised uuringud mistahes muude üksikorganismidega võrreldes tunduvalt keerulisemaks. Viimaste aastakümnete jooksul on samblike geneetilist informatsiooni kasutatud põhiliselt molekulaarse taksonoomia ja fülogeneesi uurimiseks, samal ajal kui populatsiooni tasemel uuringuid on tehtud harvem.

Käesoleva töö eesmärk on anda kirjanduse põhjal ülevaade samblike populatsioonigeneetikas kasutatavatest meetoditest ja tuua näiteid nende meetodite rakendamisest erinevates populatsiooniuuringutes. Samuti on eesmärgiks vaadelda lähemalt mõnesid uurimusi, mis käsitlevad samblike geneetilist mitmekesisust mõjutavaid tegureid hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria* [L.] Hoffm.) populatsioonide näitel, kuna see liik on olnud uuringute objektiks mitmete eri autorite poolt. Sealjuures tahame teha ka ülevaate neis uurimustes käsitletud põhilistest looduskaitsealistest soovitustest, mis on suunatud samblike geneetilise mitmekesisuse kaitseks. Viimaseks eesmärgiks on tuua näiteid sellest, kuidas samblike populatsioonigeneetilisi andmeid saab kasutada fülogeograafilistes uuringutes.

2. Samblike geneetilise mitmekesisuse uurimismeetodid

2.1. Taust

Organismide geneetilise varieeruvuse uurimisel on oluline sobiva geneetilise markeri valik. Sobiva markeri valik peaks põhinema a) tehnilisel lihtsusel ja ajasäästlikkusel, b) polümorfismi oodataval tasemel populatsioonis, c) markeri geneetilise informatsiooni sobivuse hindamisel, d) markeri päranduvusel (dominantsus, kodominantsus) (Semagn *et al.* 2006; Werth 2010).

Ehkki samblikud on liitorganismid, mis koosnevad seenest ehk mükobiondist ning vähemalt ühest fotobiondist – ehk vetikast (Randlane & Saag 2004), on talluses sageli esindatud ka endofüütsed bakterid ja seened ning lihhenikoolsed seened. Sambliku tallusest võetud DNA proovid sisaldavad seetõttu mitmete eri liikide geneetilist informatsiooni. DNA kordistamine ehk amplifitseerimine polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil on väga tundlik, seega võib väiksemgi hulk mittesoovitud liigi DNA-d proovi saastada ning viia ebavajalike PCR fragmentide tekkele, mida ei ole võimalik hiljem vajalikust eristada (Werth 2010).

Üks võimalus võõra geneetilise materjali vältimiseks DNA analüüsil on lihheniseerunud seene isoleerimine tallusest ning kasvatamine steriilsetes laboratoorsetes tingimustes. Puhtast, steriilsest kultuurist saab analüüsimiseks eraldada ainult ühe kindla seene DNA-d. Steriilsete seenekultuuride kasutamine on aga väga ajakulukas ja kallis (Werth 2010).

2.2. Varajased uuringud samblikuainete abil

Varasemates teadustöodes on vähestel juhtudel samblike populatsioonigeneetikat uuritud seente sekundaarsete metaboliitide ehk samblikuainete abil (Culberson *et al.* 1988; Culberson *et al.* 1993). Sekundaarsed samblikuained on keemilised ühendid, mida toodab mükobiont vetikkomponendilt saadud süsivesikuid modifitseerides (Randlane & Saag 2004).

Sekundaarsete samblikuainete keemilise varieeruvuse uurimine võimaldab uurida samblike looduslike populatsioonide geneetilisi mehhanisme, talluse omapära,

hübriidiseerumise toimumist, geenivoolu taset ja lokaalsete populatsioonide levikut (Brodo 1986).

Culberson *et al.* (1988) uurimistöös koguti tera-porosambliku (*Cladonia chlorophaea* [Flörke ex Sommerf.] Spreng.) erinevate kemotüüpidega kogumi looduslikust populatsioonist eoseproove. Eosed idandati ja kasvatati kunstlikul söötmel hüüfideks, seenehüüfidele inokuleeriti sobivad vetikarakud ning kasvatati samblike tallused, millest oli taas võimalik määrata samblikuaineid. 763 kultuurist ainult viiendik sisaldas õhukese kihi kromatograafia (ingl k *thin layer chromatography* ehk TLC) ja kõrgefektiivse vedelikukromatograafia (ingl k *high-performance liquid chromatography* ehk HPLC) jaoks piisaval hulgal samblikuaineid. Mitmekümnekuulise laboratoorse ettevalmistuse ja kromatograafilise analüüsi tulemusena leiti, et osad kemotüübid (nt *grayi* ja *merochlorophaea*) andsid ilmselt omavahelisi hübriide, samas kui teiste kemotüüpide (nt eelnimetatute ja *cryptochlorophaea*) vahel hübriidiseerumist ei täheldatud, mis viitab keemilisest erinevusest tulevale reproduktiivsele isolatsioonile sugulasliikide vahel.

Meetodi suurimaks puuduseks on läbiviimise suur ajakulu, mis võib ulatuda mitme aastani, ning analüüsis kasutatava lõppmaterjali vähesus võrreldes algsega, mistõttu tuleks eelistada või välja töötada ajasäästlikumaid võimalusi.

2.3. Universaalsete sõrmejälgede meetodid (*universal fingerprints techniques*)

Viimase paari aastakümne jooksul on geneetilise varieeruvuse uurimiseks rakendatud kiiremaid molekulaarseid meetodeid, mis vajavad edukaks PCR amplifikatsiooniks väga väikest DNA hulka (tavaliselt alla 5 µg). Uute tehnoloogiate areng võimaldab õigesti ettevalmistatud ja säilitatud DNA proove mitmeid kordi uuesti analüüsida (Pénzes *et al.* 2002).

2.3.1. RAPD ja AFLP

Universaalsete sõrmejälgede meetoditega, nagu RAPD (ingl k *randomly amplified polymorphic DNA* – juhuslikult amplifitseeritud polümorfne DNA) ja AFLP (ingl k *amplified fragment length polymorphism* – amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfism) saab sadu samblike talluseid ja mitmeid lookuseid analüüsida küllalt kiirelt

ja odavalt, kuid nad on mittespetsiifilised ehk amplifitseerivad DNA-d kõikidest liikidest (Werth 2010).

RAPD meetodil DNA amplifitseerimine on odav ja lihtne, põhinedes juhuslikult valitud 10-aluspaariliste praimerite kasutamisel. Praimerid hübridiseeruvad DNA komplementaarsete ahelatega, mis paiknevad genoomis juhuslikult, ning samal ajal amplifitseeritakse palju erineva pikkusega fragmente. Praimerid tuvastavad fragmentide nukleotiidsetes järjestustes deletsiooni või insertiooni korral geneetilist polümorfismi. Amplifitseeritud fragmente lahutatakse nende suuruse järgi ja visualiseeritakse agarosgeelil (Pénzes *et al.* 2002). Siiski võib tulemuste tõlgendamisel tekkida raskusi, sest sama pikkusega PCR produktid, mis ilmuvad samas geelivöödis (ingl k *gel band*), ei esinda tingimata DNA homoloogseid osi (Printzen *et al.* 1999).

AFLP meetodi puhul tuleb esmalt DNA-d töödelda restriksiooniensüümide ehk restriктаasidega (tavaliselt *EcoRI* ja *MseI*). Tekivad „kleepuvate otstega“ fragmendid, kuhu ligeeritakse kaheaahelalised adapterid. Selleks, et saaks toimuda DNA fragmentide amplifikatsioon, peavad adapteritele seonduma praimerid, mis on adapteri järjestusega komplementaarsed. Praimerite 3' otstega liidetakse 1–3 juhuslikult valitud nukleotiidi, mis kindlustab DNA amplifikatsiooni vastavalt restriksioonisaitidelt. Amplifitseerimiseks kasutatakse tavaliselt 50–100 restriksiooni fragmenti. AFLP meetodi käigus tekkinud erineva pikkusega fragmente visualiseeritakse kas agaros- või polüakrüülamiidgeelil, et tuvastada geneetilist polümorfismi (Vos *et al.* 1995). Polümorfism avaldub restriksioonisaitide erinevuses nukleotiidide muutumise tõttu või erineva pikkusega fragmentides insertiooni ja deletsiooni toimumise korral (Pénzes *et al.* 2002).

AFLP meetodi põhiliseks puuduseks on homoplaasia esinemine, mis ei lase osade eksemplaride vahelist geneetilist erinevust tuvastada. Homoplaasia avaldub kui mittehomoloogsed alleelid jagavad sama tunnuse seisundit, mis on põhjustatud mittehomoloogsete fragmentide koosrändest (ingl k *co-migration*) (Meudt & Clarke 2007).

RAPD ja AFLP markerid näitavad kõrget geneetilise varieeruvuse taset. Seetõttu kasutatakse neid markereid populatsiooni geneetilise struktuuri, vahel ka sugulussuhete ning ristumissüsteemide uurimiseks (Pénzes *et al.* 2002). Samblike populatsioonide uurimisel on neid markereid kasutatud mõnedes varasemates töödes (Heibel *et al.* 1999; Printzen *et al.* 1999; Seymour *et al.* 2005).

Puuduseks on mõlema markeri dominantsus, mis ei võimalda eristada heterosügootide dominantsetest homosügootidest (Pénzes *et al.* 2002). Lisaks ka, nagu mainitud, vajadus eelnevalt kasvatada mükobionti puhaskultuuris, ent paljud mükobiondiliigid ei ole võimelised puhaskultuuris kasvama (Werth 2010).

2.3.2. Teisi meetodeid polümorfismi uurimiseks

RFLP (ingl k *restriction fragment length polymorphisms* – restriksioonifragmentide pikkuspolümorfism) on hübriidisatsioonil põhinev molekulaarne kodominantne marker. RFLP meetodil tuvastavad restriктаasid organismide DNA fragmentide pikkuste erinevusi. Mutatsioone sisaldava DNA lõikamisel restriктаasiga tekivad teistsuguse pikkusega fragmendid, võrreldes esialgse DNA-ga. Eelnevate meetoditega võrreldes ei kasutata PCRi, vaid restriksioonifragmendid kantakse otse elektroforeesi jaoks geelile. Geelelektroforeesi käigus lahutatakse restrikteeritud DNA fragmendid pikkuse järgi üksteisest ja denatureeritakse üksikahelaliseks, mida analüüsitakse edasi geneetilise polümorfismi leidmiseks *Southern*'i hübriidisatsiooni meetodil (Semagn *et al.* 2006).

RFLP analüüsi puuduseks on see, et vajatakse suurt hulka kvaliteetset DNA-d, samuti on meetod kallis ja ajakulukas. Praeguseks on RFLP meetod populatsiooni struktuuri uurimiseks asendatud tõhusamate PCRil põhinevate üksiklookuseliste meetoditega (Pénzes *et al.* 2002).

ISSR (ingl k *inter simple sequence repeat* – vahelmine lihtne kordusjärjestus) on dominantne multilookuseline marker. ISSR meetodi puhul amplifitseeritakse DNA-d, mis on kahe identse üksteisega vastupidises suunas oleva mikrosatelliidi kordusjärjestuse vahel. Meetod kasutab mikrosatelliitide kordusi kui praimereid, kusjuures kordused võivad olla kahe kuni viie nukleotiidi pikkused. Nii nagu RAPD ja AFLP puhul ei ole ka ISSR meetodi jaoks vaja teada DNA nukleotiidset järjestust (Semagn *et al.* 2006).

Varasemalt on samblike populatsioonigeneetikas kasutatud ühes uurimistöös mitut eelnimetatud sõrmejäljemeetodit, näiteks ISSR ja RAPD markereid, kusjuures mõlemad on kiired, odavad, kõrgelt polümorfsed ning kogu genoomi ulatuses juhuslikult levinud (Yüzbaşıoğlu *et al.* 2011). Samuti on kasutatud koos näiteks ISSR ja RFLP markereid (Cassie 2006) ning RFLP markerit ja ribosomaalse DNA (rDNA) lookusi (Kotelko *et al.* 2008).

2.4. Eri lookuste sekveneerimine

Sekveneerimisega määratakse kindlaks DNA nukleotiidide järjestus ehk DNA primaarstruktuur. Tänu spetsiifiliste praimerite välja töötamisele viimase kümnendi jooksul, on lihheniseerunud seente ja fotobiontide ribosomaalse geeniklastri DNA eri lookuste järjestusi aina rohkem kasutusel. Polümorfismi näitajaks võib olla näiteks erinevate haplotüüpide arv uuritavas lookuses (Werth 2010).

Kõige tavalisemad samblike populatsioonigeneetika ning fülogeneesi uurimiseks kasutatavad järjestused on rDNA mittekodeerivad lookused: ITS (ingl k *internal transcribed spacer* – sisemine transkribeeritav ala), IGS (ingl k *intergenic spacer* – geenidevaheline ala), SSU (ingl k *small subunit* – väike alaühik) ja LSU (ingl k *large subunit* – suur alaühik) (Werth 2010). Kuna tuuma ribosomaalne ITS (nrITS) lookus on enamikus seeneliikides küllalt konserveerunud, siis saab selle abil tuvastada pigem liikidevahelisi, mitte populatsioonidevahelisi erinevusi (Sadowska-Des *et al.* 2013; Schoch *et al.* 2012).

rDNA markerite kasutamise probleemiks on see, et rDNA lookused on omavahel füüsiliselt seotud, mis ei võimalda rDNA lookuste järjestustest eraldiseisvat geneetilist informatsiooni leida (Werth 2010).

Kasutatud on ka mitmeid valke kodeerivaid lookusi: GPD, MCM7, RPB1, RPB2, TSR1 ja TUB (Sadowska-Des *et al.* 2013). Neist 2 lookust (MCM7 ja TSR1) on näidanud hiljutistes samblike populatsioonigeneetika uuringutes piisavalt kõrget polümorfismi taset (Leavitt *et al.* 2011; Sadowska-Des *et al.* 2013; Spribille *et al.* 2011), samas kui lookuste RPB1 ja RPB2 kohta on leitud, et need on populatsiooni tasemel väga vähe või üldse mitte varieeruvad (Sadowska-Des *et al.* 2013; Wirtz *et al.* 2012).

Valke kodeerivate geenide PCR ja sekveneerimise korral on universaalsete praimerite kasutamine problemaatiline, seega tuleks neile disainida spetsiifilisemaid praimereid (Schoch *et al.* 2012).

Kuna erinevate lookuste järjestused pole populatsioonide sees või vahel alati piisavalt varieeruvad, siis see ongi peamine põhjus, miks otsitakse populatsiooniuringuteks ka muid meetodeid.

2.5. Mikrosatelliidid

Samblike puhul on paljuliigilise geneetilise materjali analüüsiks otstarbekas kasutada mükobiondile spetsiifilisi markereid (Zoller *et al.* 1999; Walser *et al.* 2003). Üheks selliseks on lihtsad kordusjärjestused (ingl k *simple sequence repeat* ehk SSR), mille hulka kuuluvad mikrosatelliidid (Werth 2010).

Mikrosatelliidid on kõrge varieeruvusega, selektiivselt neutraalsed DNA polümorfseid lookused, mis sisaldavad lühikesi, 1–6 nukleotiidi pikkusi tandeemseid kordusi, mis on esindatud kõigi eukarüootide genoomis (Tautz & Renz 1984). Kuna mikrosatelliitide praimereid saab disainida spetsiifiliselt ühele sambliku sümbiondile, siis on võimalik lihtsate kordusjärjestuste (SSR) markerit kasutada kogu sambliku talluse DNA proovis (Werth 2010). Nii pole teise, mittesoovitud sümbiondi geneetiline materjal enam probleemiks, võrreldes meetoditega, mis kasutavad universaalseid praimereid (Selkoe & Toonen *et al.* 2006).

Mikrosatelliidid on võrreldes selliste sõrmejälje meetoditega, nagu RAPD ja AFLP üksiklookuselised ning kodominantsed, mis võimaldavad alleelide sõltumatut avaldumist leida (Selkoe & Toonen *et al.* 2006). Mikrosatelliidid on hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria* [L.] Hoffm.) puhul näidanud kõrgemat populatsioonisisest polümorfismi taset (Werth *et al.* 2006), võrreldes rDNA markerite kasutamisega (Zoller *et al.* 1999).

Mikrosatelliitide puudus avaldub selles, et markerit saab kasutada ainult nendel liikidel, mille jaoks on praimerid disainitud (Werth 2010). Uue taksoniga tööd alustades tuleb täiesti uus praimer luua, mis on alguses küll kallis ning ajakulukas, kuid valmis saades edaspidiseks kasutamiseks odav ja kiire vahend (Selkoe & Toonen *et al.* 2006). Ajakulukaks muudab praimeri disainimise isoleeritud mükobiondi aeglane kasv puhaskultuuris (Widmer *et al.* 2010).

Seni on mikrosatelliitide praimerid disainitud nelja samblikku moodustava seeneliigi jaoks (Sadowska-Des *et al.* 2013), sealjuures liikide *Lobaria pulmonaria* (Walser *et al.* 2003; Dal Grande *et al.* 2010; Widmer *et al.* 2010) ja *Parmotrema tinctorum* (Delise ex Nyl.) Hale (Mansournia *et al.* 2012) puhul on praimerid olemas ka teisele sümbiondile. Liikide *Peltigera dolichorhiza* (Nyl.) Nyl. (Magain *et al.* 2010) ja *Buellia frigida* Darb. (Jones *et al.* 2012) puhul fotobiondi praimereid veel ei ole. Lisaks on mikrosatelliitide praimerid olemas rohevetikale (*Trebouxia decolorans* Ahmadjian), mis

toimib näiteks liikide harilik korpsamblik (*Xanthoria parietina* [L.] Th. Fr.) ja harilik ripssamblik (*Anaptychia ciliaris* [L.] Körb.) fotobiondina (Dal Grande *et al.* 2013).

Siiski on praimerid disainitud veel liiga vähestele ja haruldastele liikidele. Näiteks liigid *Parmotrema tinctorum* (Consortium of North American Lichen Herbaria) ja *Peltigera dolichorhiza* on pantroopilise levikuga (Magain *et al.* 2010) ja liik *Buellia frigida* on Antarktikas levinud endeem (Jones *et al.* 2012). Ent laiema levikuga liigi *Lobaria pulmonaria* jaoks disainitud praimerid on rakendatavad ka mõnede vähestele lähedastele liikidele, nagu *Lobaria immixta* Vain. ja *Lobaria meridionalis* Vain. (Walser *et al.* 2003).

Mikrosatelliidid, nagu varem mainitud, on potentsiaalsed populatsioonigeneetikas kasutatavad molekulaarsed markerid, näidates kõrget polümorfismi taset võrreldes mõne teise markeriga. Tulevikusuunaks võiks olla rohkematele samblikku moodustavatele seeneliikidele ja nende sümbiontidele mikrosatelliitide praimerite välja töötamine, mis võimaldaks samblike populatsioonigeneetikat nii liikide sees kui vahel lähemalt uurida.

3. Samblike geneetilist mitmekesisust mõjutavad tegurid hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) näitel

3.1. Häiringud

Häiringud – nii looduslikud kui ka inimtekkelised – võivad põhjustada populatsioonide elupaiga olulist kahanemist, ning siis väheneb ka antud populatsiooni suurus. Nii võib populatsioon jõuda geneetilise mitmekesisuse osas „pudelikaelani“, mille üheks tagajärjeks on haruldaste alleelide kadumine, mis vähendab geneetilist mitmekesisust (Hartl & Clark 1997). Samas võivad aja jooksul populatsiooni lisandunud uued organismid rikastada geneetilist mitmekesisust ning nn pudelikaelaefektist tingitud mõjud kaovad (Werth *et al.* 2006).

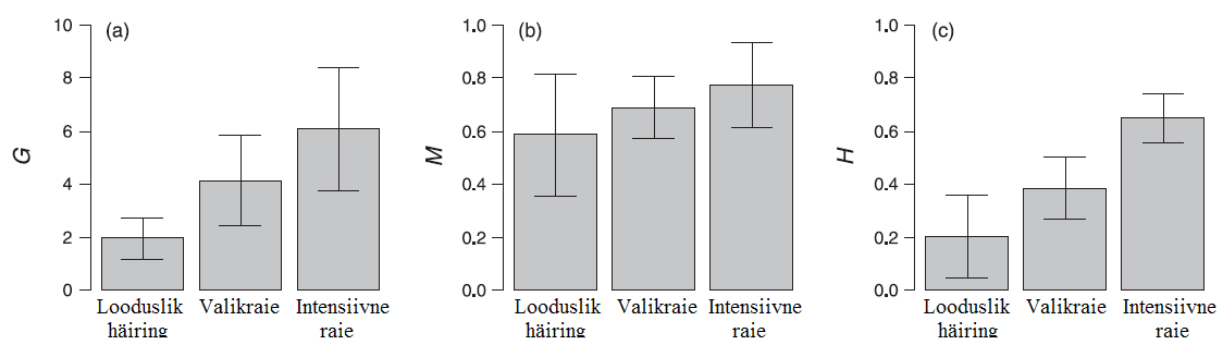
Epifüütseid taimi uurides on leitud, et häiritud ja ruumiliselt isoleeritud populatsioonides on geneetiline mitmekesisus madalam kui häirimata populatsioonides (González-Astorga *et al.* 2004; Trapnell & Hamrick 2005). Huvitav oleks teada, kas selline seaduspärasus kehtib ka epifüütsete samblike kohta. Samblikud on võrreldes soontaimedega aeglasema kasvuga, seetõttu häiringud, nagu tulekahjud, peaksid omama samblikukooslustele pikaajalisemat mõju (Schulten 1985).

Varem on eeldatud, et vanadest metsadest sõltuvad samblikud on häiringutest, põhiliselt näiteks raiest põhjustatud elupaikade kaost, negatiivselt mõjutatud. Näiteks on võrreldud vanu metsapuistuid ja raiest mõjutatud puistuid, kasutades retrospektiivset meetodit ning vaatlusandmeid, millega saab anda hinnangu samblike üldise elurikkuse muutusele (Peterson & McCune 2001), kuid mitte geneetilisele mitmekesisusele. Mõned aastad hiljem, seoses mikrosatelliitide praimerite väljatöötamisega sambliku *Lobaria pulmonaria* mükobiondile (Walser *et al.* 2003), hakati muuhulgas uurima ka häiringute mõju samblike geneetilisele mitmekesisusele.

Näiteks Šveitsi vanades metsades on uuritud samblikku moodustava seene *Lobaria pulmonaria* geneetilise mitmekesisuse sõltuvust häiringutüüpidest kuue mükobiondispetsiifilise mikrosatelliidilookuse (*LPu03*, *LPu09*, *LPu15*, *LPu16*, *LPu20*, *LPu27*) abil (Werth *et al.* 2006). Häiringutüüpidena puistu tasandil käsitleti looduslikke häiringuid (tulekahju, tuulemurd) ning inimpõhjustatud häiringuid (intensiivne raie ja erivanuselise puistu valikraie). Kõikidelt uuritud häiringualadelt leiti suuri *Lobaria pulmonaria* populatsioone. Siit tekkis küsimus, kuidas rekolonisatsioonisündmused nii

erinevatel häiringualadel aset leidsid ning kuidas häiringud on mõjutanud lokaalset geneetilist mitmekesisust.

Werth *et al.* (2006) leidsid, et geneetiline mitmekesisus ning multilookuseliste genotüüpide arv ja protsent on intensiivse raiega aladel, võrreldes loodusliku häiringualadega ja valikraiealadega, häiringust hoolimata üpris kõrge (Joonis 1). Samuti leiti, et looduslikud häiringud ei piira tingimata *Lobaria pulmonaria* populatsioonide ruumilist levikut ja geneetilist mitmekesisust pikema aja järel. Põhjuseks võib olla uuritaval alal paiknev suur kohalik *Lobaria pulmonaria* leviste pank ning mitmete iseseisvate kolonisatsiooni sündmuste esinemine ja kiire klonaalne levik deemide vahel. Kuid aladel, kus *Lobaria pulmonaria* leviste pank on väike või vahemaa lähima potentsiaalse asutajapopulatsiooniga on liiga suur, omavad puistu tasandil häiringud *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilisele mitmekesisusele pikemaajalist pärssivat mõju. Valikraiealasid uurides selgus, et ka neis võib hoolimata häiringust säilida kõrge geneetiline mitmekesisus. Uuritud alal tehti kuuskede (*Picea abies* [L.] Karst) ja pöökide (*Fagus sylvatica* L.) valikraiet, millest esimesed on *Lobaria pulmonaria* jaoks sobimatu substraat, ja viimased on teisese tähtsusega peremeespuud (Kalwij *et al.* 2005). Seega võib arvata, et kuuskede (*Picea abies*) ja pöökide (*Fagus sylvatica*) selektiivne raie on *Lobaria pulmonaria* jaoks kasulik, säilitades ja suurendades peremeespuu, mägivahtra (*Acer pseudoplatanus* L.) levikut ning tihedust.



Joonis 1. Hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) populatsioonide geneetilise mitmekesisuse mõnede näitajate (G, M ja H) tasemed Šveitsi metsades eri häiringutüüpide korral (Werth *et al.* 2006 järgi). G – multilookuseliste genotüüpide arv populatsioonis, M – multilookuseliste genotüüpide protsent populatsioonis, H – Nei geneetilise mitmekesisuse näitaja populatsioonis.

Hiljutises uuringus Kagu-Euroopa ürg- ja majandusmetsades leiti, vastupidiselt Šveitsi uuringule, et range kaitsega ürgmetsades on *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetiline mitmekesisus tunduvalt kõrgem kui majandusmetsades, kusjuures juba vähene metsamajandustegevus vähendas tunduvalt *Lobaria pulmonaria* geneetilist mitmekesisust (Scheidegger *et al.* 2012).

Varasemalt on 35 aasta pikkuse generatsiooniajaga samblikku moodustava seene *Lobaria pulmonaria* levikuvõimet peetud piiratuks (Scheidegger & Goward 2002), kuid on teada, et samblike levised (nt askosporid) on võimelised levima ja koloniseerima pika vahemaa taga olevaid metsade laike ning alasid, mis on olnud häiringutest mõjutatud (Bailey 1976). Seepärast peaks metsadünaamika olema *Lobaria pulmonaria* generatsiooniga arvestav ning diasporide leviku võimaldamiseks kohane, et säilitada puistus liigi püsivus. Paraku on seniste uuringute tulemused häiringute mõjust *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilisele mitmekesisusele vastuolulised ning ühest üldistust häiringute mõjust samblike geneetilisele mitmekesisusele teha ei saa, mistõttu tuleks sama probleemiga tegeleda ka teistes piirkondades või kasutades teisi liike.

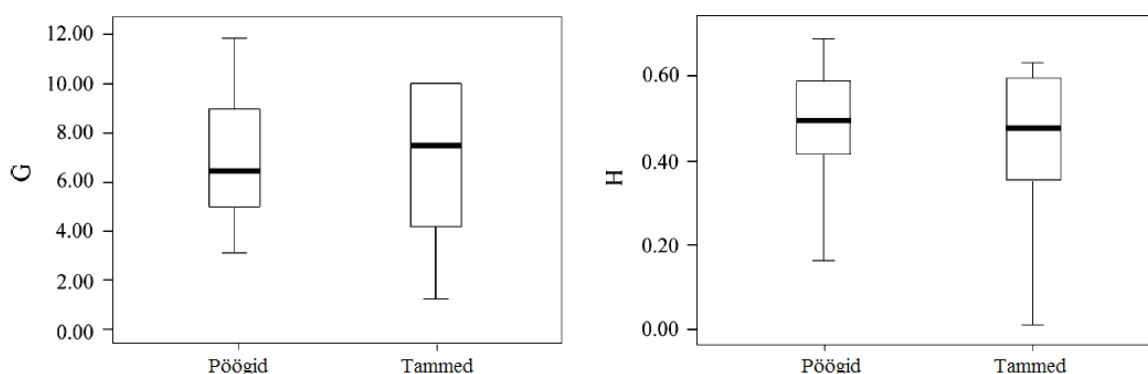
3.2. Fragmenteerumine

Fragmenteerumine on elurikkusele ülemaailmselt tõsine oht, vähendades sobivate elupaikade arvu, suurendades elupaigalaikude vahelist isolatsiooni ja muutes jäänukalade biootilisi ning abiootilisi tingimusi (Fahrig 2003). Seega on oluline mõista, kuidas mõjuvad fragmenteeritud elupaigad populatsioonide elujõulisusele, sealhulgas samblike populatsioonigeneetikale, ning sellest tulenevalt pakkuda välja kaitsemeetmeid fragmenteeritud alade populatsioonide jaoks.

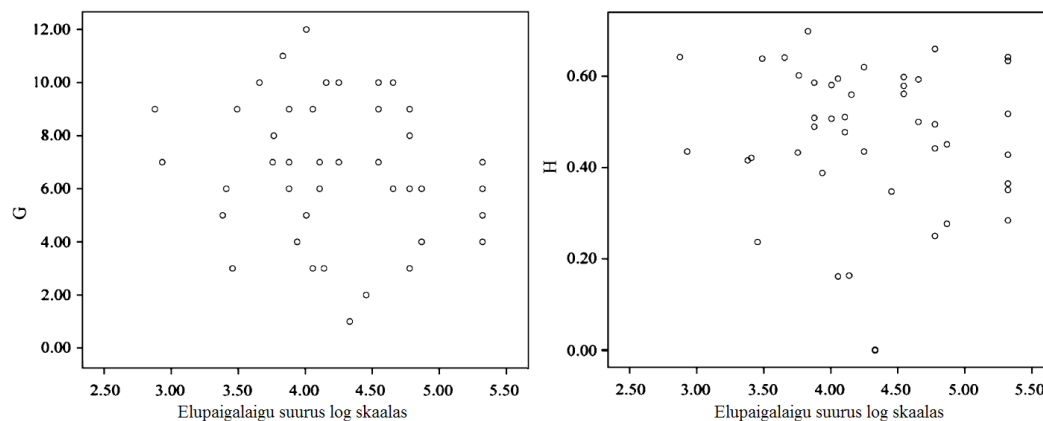
Vahemerelise metsaga aladel, näiteks Hispaanias, on uuritud kasvupaiga fragmenteerumise mõju *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilisele struktuurile ja mitmekesisusele kolme mükobiondispetsiifilise mikrosatelliidi lookuse (*LPu03*, *LPu09* ja *LPu15*) abil (Otálora *et al.* 2011). Võrreldi liigi lokaalset geneetilist mitmekesisust ja struktuuri metsa elupaigalaikudes selle omaduste (sh elupaigalaigu suurus, fragmentide sidusus, ümbritsev maatriks, peremeespuu liik, peremeespuu vanus) suhtes. Eesmärgiks oli kindlaks teha, millised eelpool mainitud omadustest mõjutavad *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilist mitmekesisust ja struktuuri. Vaadeldud mosaiiksel alal domineerisid pöögid (*Fagus sylvatica*) ning pürenee tammed (*Quercus pyrenaica* Willd.),

ja neid alasid ümbritsesid kanarbikunõmmed (domineerivad liigid *Erica arborea* L. ja *Erica australis* L.) ning männiistandused (*Pinus sylvestris* L.). Uuritav ala oli jaotatud 3 regiooniks, mille sees asus 31 elupaigalaiku (ingl k *patches*), mis omakorda sisaldasid 44 erinevat 400 m² suurust uuringuala (ingl k *plots*).

Leiti, et eri elupaigalaikude geneetiline mitmekesisus ei olnud mõjutatud metsatüübist (pöök või tamm), ega elupaigalaigu suuruselt (Joonis 2, 3). Kõige suurem geneetiline varieeruvus leiti 400 m² uuringualade piires. Järgnes oluline geneetiline varieeruvus eri regioonide piires uuringualade vahel, kuid geneetiline varieeruvus regioonide vahel ei olnud statistiliselt oluline. Leiti ka nõrk, kuid statistiliselt oluline geneetiline erinevus elupaigalaikude vahel. Vastupidiselt eelnevalt arvatule leiti, et samblikupopulatsioonide geneetiline mitmekesisus on enamikes elupaigalaikudes suhteliselt kõrge, võrreldaval tasemel Šveitsi vanade metsade häiringualadel uurituga (Werth *et al.* 2006), kus aga uuritud alad olid tunduvalt suuremad. Eeldati, et väikestel ja vähe seotud elupaigalaikutel on geneetilise mitmekesisuse tase madal ja geneetilise eristumise tase kõrgem võrreldes seotud elupaigalaikude populatsioonidega. Selgus, et *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetiline mitmekesisuse vähenemine isoleeritud metsafragmentides ei leidnud kinnitust. Ka elupaigalaike iseloomustavad näitajad, nagu sidusus koos fragmente ümbritseva maatriksiga (männid pole sobivaks substraadiks), ei mõjutanud *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilist mitmekesisust.



Joonis 2. Hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) populatsioonide geneetilise mitmekesisuse näitajad (G ja H) sõltuvalt metsatüübist (domineeriva puuliigi järgi) (Otálora *et al.* 2011 järgi). G – multilookuseliste genotüüpide arv populatsioonis, H – Nei geneetilise mitmekesisuse näitaja populatsioonis.



Joonis 3. Elupaigalaigu suuruse (m^2) ja hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) geneetilise mitmekesisuse näitajate vaheline suhe (Otálora *et al.* 2011 järgi). G – multilookuseliste genotüüpide arv populatsioonis, H – Nei geneetilise mitmekesisuse näitaja populatsioonis.

Kuigi populatsioonigeneetika teooria järgi peaks fragmenteerumine isoleeritud väheste organismidega alampopulatsioonideks viima üldise geneetilise mitmekesisuse ammendumiseni (Ellstrand & Elam 1993), näidati antud uuringus, et ainult kasvupaiga kvaliteet (st elupaigalaigu vanus: määratud laiku asustavate puude tüve keskmise läbimõõduga) avaldas vähesel määral geneetilisele mitmekesisusele mõju. Elupaigalaigu vanusest tulenevalt osutusid *Lobaria pulmonaria* populatsioone kandvad vanade puudega uuringualad geneetiliselt rohkem sarnasteks kui elupaigalaigud, mis on geograafiliselt üksteisele lähedal, kuid noorte puudega. See näitab, et noortele elupaigalaikudele iseloomulik geneetiline struktuur on seletatav vanadest metsadest pärit harvade, juhuslike kolonisatsioonisündmustega, millele järgneb koloniseerunud organismide klonaalne levik (Werth *et al.* 2006). Seega ei ole levikuvõimekus elupaiga fragmenteerituse pärast märkimisväärselt kahanenud. Asjaolu, et metsa vanus mõjutab epifüütsete liikide geneetilist struktuuri, kinnitab hüpoteesi, et leviku protsesside jaoks on aeg suurema tähtsusega kui ruumilised tegurid (Young *et al.* 1996).

Põhjus, miks geneetiline mitmekesisus elupaigalaikudes on püsinud suhteliselt kõrgena võib olla selles, et kuna fragmenteeritud elupaikade korral geenitriivi mõju süveneb generatsioonide arvu suuremisega, siis ebasoodsad geneetilised tagajärjed on paremini märgatavad lühikese generatsiooniajaga liikidel (Young *et al.* 1996). Seega ei ole pika generatsiooniajaga *Lobaria pulmonaria* populatsioonidele veel geenitriivi tugev mõju selgelt avaldunud, arvestades, et metsamaastiku fragmenteerumine toimus 1960. aastatel.

Arvatavasti peegeldavad elupaiga fragmentide geneetilist mitmekesisust iseloomustavad näitajad hoopis olukorda 50 aasta tagust aega enne fragmenteerumist.

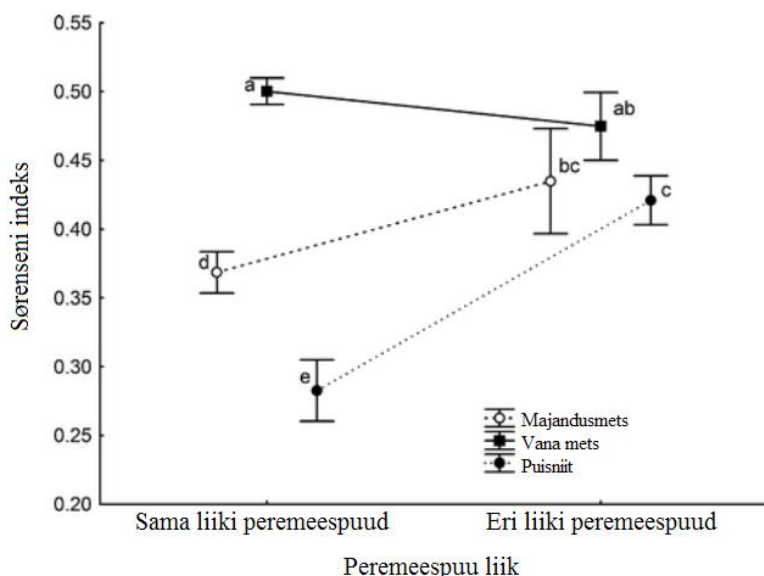
Lobaria pulmonaria populatsioonide geneetilist mitmekesisust on uuritud ka põhjapoolkera parasvöötme fragmenteerunud vanades vihmametsades Kesk-Norras kolmel uuringualal kaheksa mükobiondispetsiifilise mikrosatelliidi lookuse (*LPu03*, *LPu09*, *LPu15*, *LPu23*, *LPu24*, *LPu25*, *LPu28*, *MS4*) abil (Hilmo *et al.* 2012). Eeldati, et fragmenteerumine on viinud *Lobaria pulmonaria* populatsioonid geneetilise ammendumiseni. Sarnaselt fragmenteerunud vahemerelise metsaga aladele (Otálora *et al.* 2011), leiti ka vihmametsalaikudel epifüütsete samblike kõrge geneetiline mitmekesisus. Arvatavasti on suhteliselt kõrge geneetilise mitmekesisuse üheks põhjuseks uuritud populatsioonide suur geneetiliselt efektiivne populatsiooni suurus (N_e) (Hilmo *et al.* 2012). Populatsiooni efektiivne suurus vastab „ideaalsele“ populatsioonile, kus ristumine on juhuslik, kõigil isenditel on võrdne tõenäosus paljunemiseks ja populatsiooni suurus ei muutu põlvkondade vahel (Kliman *et al.* 2008). Populatsiooni pikemaajaliseks säilimiseks peab populatsiooni efektiivne suurus olema piisavalt suur, et toimida geenitriivi mõju vähendajana, tagades nii geneetilise varieeruvuse säilimise (Hilmo *et al.* 2012). Võrreldes varasemate Euroopas tehtud *Lobaria pulmonaria* populatsioonide uuringutega, kasutades samu geneetilisi markereid (Jüriado *et al.* 2011; Otálora *et al.* 2011), leiti antud töös, et *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetiline varieeruvus Kesk-Norra vanades vihmametsades on suhteliselt kõrgem, mis tuleneb ilmselt geneetilise mitmekesisuse säilimisest. Varem mainitud samblike pikk generatsiooniaeg koos klonalise paljunemisega võib säilitada geneetilist mitmekesisust. Leiti ka madal diferentseerumistase populatsioonide vahel koos kõrge migratsioonitasemega, mis viitab fragmentide suhteliselt heale sidususele. Seetõttu peaks Kesk-Norras kaitseprioriteedid suunama kõrge geneetilise mitmekesisusega metsafragmentide säilitamisele (Hilmo *et al.* 2012).

3.3. Kasvupaiga kvaliteet

Eestis on samblikku moodustava seene *Lobaria pulmonaria* geneetilist mitmekesisust uuritud kaheksa mükobiondispetsiifilise mikrosatelliidi lookuse (*LPu03*, *LPu09*, *LPu15*, *LPu23*, *LPu24*, *LPu25*, *LPu28*, *MS4*) abil Kirde- ja Edela-Eesti kolmel erineval puudega alal: vanades metsades, majandusmetsades ja puisniitudel (Jüriado *et al.* 2011). Uuriti, kas geneetiline erinevus *Lobaria pulmonaria* isendite vahel eri elupaigatüüpide puhul on

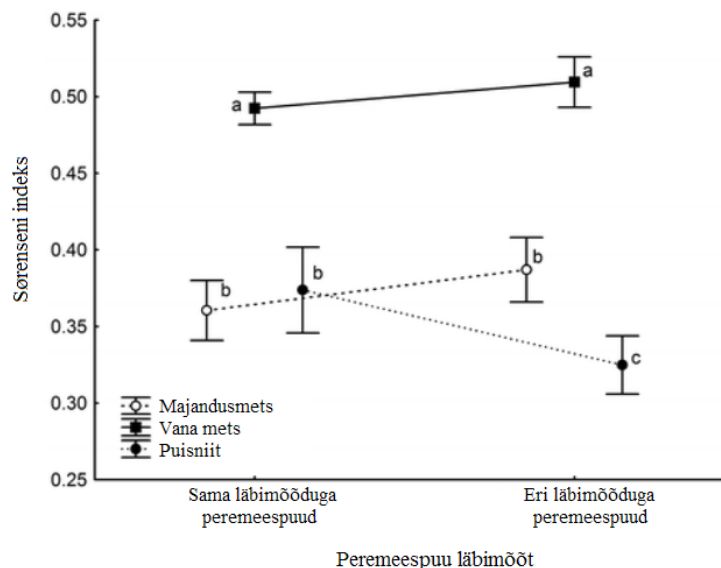
mõjutatud kasvukoha spetsiifikast (peremeespuu liigist, peremeespuu läbimõõdust ja puudevahelisest kaugusest).

Leiti, et *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetiline mitmekesisus varieerus eri elupaigatüüpide vahel. Geneetiline mitmekesisus oli oluliselt kõrgem vanades metsades kui majandusmetsades ja puisniitudel ning oli positiivses korrelatsioonis puistu vanusega. *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilise erinevuse (Sørenseni indeks) analüüsil leiti, et esineb elupaigaspetsiifiline geneetilise erinevuse muster. Vastupidiselt eelmises peatükis mainitule, kus fragmenteeritud metsa samblike geneetiline mitmekesisus ei sõltunud puuliigist (Otálora *et al.* 2011), olid Jüriado *et al.* (2011) järgi sama liiki peremeespuudel kasvavad *Lobaria pulmonaria* isendid geneetiliselt sarnasemad kui eri liiki peremeespuudel kasvavad isendid, aga see ilmnes ainult majandusmetsa ja puisniidu puhul (Joonis 4). Selline erinevus tuleneb ilmselt sellest, et näiteks majandusmetsas domineeris üks või mõned puuliigid. Iseäranis väike geneetiline erinevus samal puuliigil kasvavate isendite vahel leiti puisniitudel. Samas, vanade metsade populatsioonide *Lobaria pulmonaria* isendite vahel oli geneetiline erinevus suur sõltumata peremeespuuliigist. Seega tuleks majandusmetsades puistu valikraiel säilitada mitmeid erinevaid peremeespuu liike, et tagada võimalus epifüütsete samblike suuremale geneetilisele mitmekesisusele.



Joonis 4. Hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) individide geneetilise erinevuse tase (Sørenseni indeks) sama liiki ja eri liiki peremeespuudel kolmes uuritud elupaigatüübis (Jüriado *et al.* 2011 järgi). Tähed a–e tähistavad homogeensusgruppe (vastavalt Fisher LSD testile).

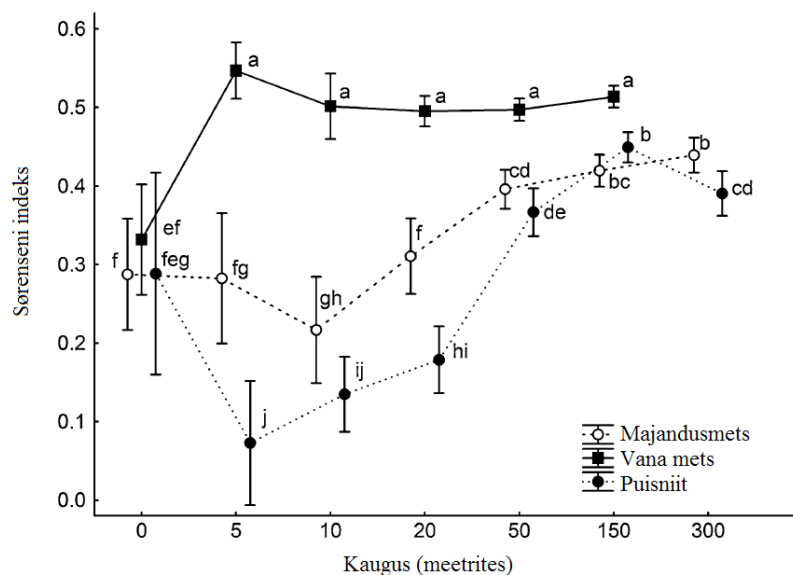
Lisaks peremeespuu liigi mõjule, leiti eri läbimõõduga peremeespuude elupaigatüübispetsiifiline mõju geneetilisele erinevusele (Joonis 5). Vanades ja majandusmetsades ei sõltunud geneetiline erinevus naaberperemeespuude läbimõõdust, puisniitudel aga olid erineva läbimõõduga peremeespuudel kasvavad samblikud geneetiliselt sarnasemad, kui sama läbimõõduga naaberperemeespuudel kasvavad isendid (Jüriado *et al.* 2011). Samas vahemereliste fragmenteeritud metsade puhul oli puu übermõõt (seotud elupaigalaigu vanusega) kõige olulisemaks kasvupaiga kvaliteedi mõjutajaks – geneetiline mitmekesisus suurenes puu tüve keskmise läbimõõdu suurenemisel, st struktureeritud metsades on oluline vanade puude olemasolu samblike populatsioonide suuruse ja geneetilise mitmekesisuse säilitamisel (Otálora *et al.* 2011).



Joonis 5. Hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) indiviidide geneetilise erinevuse tase (Sørenseni indeks) sama läbimõõduga ja eri läbimõõduga peremeespuudel kolmes uuritud elupaigatüübis (Jüriado *et al.* 2011 järgi). Tähed a–c tähistavad homogeensusgruppe (vastavalt Fisher LSD testile).

Viimaseks leiti, et peremeespuude vahelise kauguse ja *Lobaria pulmonaria* isendite geneetilise erinevuse suhe on kasvukohaspetsiifiline, mis ilmnes eriti, kui puudevaheline kaugus oli 1–50 meetrit (Joonis 6). Vanades metsades olid naaberpuudel kasvavad isendid geneetiliselt erinevamad võrreldes samal puutüvel kasvavate isenditega juba lühikese puudevahelise vahemaa järel (1–5 m). Ent puisniitudel olid naaberpuudel kasvavad isendid lühikese vahemaa taga (1–20 m) geneetiliselt sarnasemad kui isendid, kes kasvasid samal

puutüvel. Kui puudevaheline kaugus oli suur (50–300 m), siis isendite geneetiline erinevus kasvas. Majandusmetsade puhul jäi geneetiline erinevuse muster vahepealseks, kusjuures puu piires geneetiline erinevus säilis kuni 20 meetrini, misjärel hakkas edasise puudevahelise vahemaa suurenemisel ka geneetiline erinevus suurenema. Sellest tulenevalt leiti, et vanad metsad on geneetiliselt mitmekesisemad kui majandusmetsad ning puisniidud, sest organismide vaheline geneetiline erinevus ilmnes juba 5 meetrise peremeespuude vahelise kauguse järel. Kaitse seisukohast tulenevalt peaks potentsiaalseid peremeespuuid säilitama vanade puude naabruses (15–30 m), et suurendada uue elupaiga asustamise tõenäosust (Jüriado *et al.* 2011).



Joonis 6. Hariliku kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) indiviidide geneetilise erinevuse tase (Sørenseni indeks) eri kaugustel olevatel peremeespuudel kolmes elupaigatüübis (Jüriado *et al.* 2011 järgi). Tähed a–j tähistavad homogeensusgruppe (vastavalt Fisher LSD testile).

Puudevaheline kaugus, kust alates geneetiline erinevus ületab puu piires esineva geneetilise erinevuse taseme, on ühtlasi ka vahemaa, mil suguline paljunemine hakkab domineerima vegetatiivse paljunemise üle. Vastavalt sellele saab väita, et puisniitudel ja majandusmetsas domineeris *Lobaria pulmonaria* isendite vegetatiivne paljunemine ja klonaalne levik. Märgatav geneetiline mitmekesisustumine nendes kasvupaikades toimus 21–50 meetri vahel, kust alates suguline paljunemine hakkas domineerima vegetatiivse paljunemise üle. Puisniitude puhul märgatud suur klonaalse leviku tase on seotud suure

hulga juveniilide esinemisega, samal ajal kui generatiivsete isendite esinemissagedus oli madal. Arvatavasti on *Lobaria pulmonaria* populatsioonide madal üldine fertiilsus puisniitudel põhjustatud sobiva ristumispartneri nappusest. Majandusmetsades oli fertiilsete isendite hulk suurem kui vanades metsades ja puisniitudel, mis on põhjustatud majandusmetsa optimaalsetest mesokliimatilistest jm omadustest (piisav valguse kättesaadavus, sobiva ristumispartneri olemasolu) (Jüriado *et al.* 2011). Suguliselt paljunevate isendite suur hulk näitab, et populatsioon kasvab aktiivselt, aga see võib ikkagi olla ebapiisav, et valikraiest tuleneva negatiivse mõju tingimustest säilitada populatsiooni elujõulisus (Edman *et al.* 2008). Ent Kagu-Euroopa ürg- ja majandusmetsade samblikupopulatsioonide geneetilise mitmekesisuse võrdluses leiti, et majandusmetsades leitud samblikupopulatsioonide geneetiline mitmekesisus on võrreldes ürgmetsade samblikupopulatsioonidega madalam vahemaal kuni 170 m (Scheidegger *et al.* 2012). Kuna klonaalne levik domineerib lühikesel distantil (Werth & Scheidegger 2012), siis on majandusmetsades samblikku moodustaval seenel *Lobaria pulmonaria* oma leviku ulatuses vähem genotüüpe ruumiliselt segunenud võrreldes ürgmetsadega. Sugulisel paljunemisel vajaliku sobiva ristumispartneri levik on pikast peremeespuude vahelisest kaugusest piiratud, mis omakorda vähendab geenivoolu võimalikkust ja seega vähendab ka *Lobaria pulmonaria* populatsioonide geneetilist mitmekesisust (Scheidegger *et al.* 2012).

Uuritud *Lobaria pulmonaria* populatsioonide kasvupaikade kaitse peaks keskenduma piisava valguse kättesaadavuse, puistu struktuurse mitmekesisuse ja peremeespuude olemasolu tagamisele (Jüriado *et al.* 2011). Pikas perspektiivis ei pruugi *Lobaria pulmonaria* populatsioonid majandusmetsas olla elujõulised, sest populatsioonide mitmekesisus sõltub vanade metsade olemasolust. Ent vastavalt väljasuremisvõla teooriale võivad säilinud vanades metsades samblikupopulatsioonide liigirikkus ja geneetiline mitmekesisus jätkuvalt väheneda, sest aastakümneid või -sadu tagasi toimunud negatiivsed mõjud (nt kasvupaikade sidususe järjepidev vähenemine) võivad pika generatsiooniajaga organismidele avalduda alles tulevikus (Öckinger & Nilsson 2010). Seega peaks ennekõike kaitsma piisavate meetmetega vanu metsi. Ürgmetsade kaitsmise ja säilitamise vajalikkust kinnitavad ka Scheidegger *et al.* (2012), kes leidsid, et ainult ürgmetsad ja metsareservaadid suudavad säilitada elupaikade sidusust sajandite jooksul ning hoida geneetilist mitmekesisust.

4. Geneetilise mitmekesisuse kasutamine samblike fülogeograafilistes uuringutes

Fülogeneetilised meetodid ja mudelid, mis kasutavad populatsioonigeneetilisi andmeid, võimaldavad fossiilsetest andmetest sõltumata taastada populatsiooni struktuuri ja leviku ulatuse minevikus (Ronquist & Sanmartín 2011). Samblike puhul on ainult fossiilse materjali põhjal, mis on tihti puudulik või vähene, liigi tõepärase leviku ulatuse määratlemine raskendatud (Printzen *et al.* 2013).

Paljudel samblikel on lisaks suurele leviku ulatusele ka võrreldavalt lai ökoloogiline nišš. Näiteks valdavalt polaaraladel elutsevad liigid on levinud ka parasvöötme piirkondadesse ja vastupidi (Printzen 2008). Kooriksamblikke moodustavate seeneliikide piiritlemine ja tegelik leviku ulatus on sageli ebaselge, mistõttu biogeograafiliste järelduste tegemine on keeruline. Ka samblike sümbiontne olemus takistab leviku ulatuse täpset määratlemist, sest levimisvõime võib lisaks piiratud mükobiondi levikule olla mõjutatud veel sobiva fotobiondi puudumisest (Printzen *et al.* 2013).

Ühes hiljutises fülogeograafilises töös (Printzen *et al.* 2013) prooviti välja selgitada mõlemal poolkeral laialt levinud sarv-käosambliku (*Cetraria aculeata* [Schreb.] Fr.) evolutsioneerumispaika ning laia leviku põhjust. Fossiilmaterjali puudumise tõttu kasutati geneetilist informatsiooni, mis sisaldab ajaloolise leviku ulatuste muutuste kohta olulist teavet. Tavaliselt eeldatakse, et püsivas populatsioonis kuhjub geneetiline mitmekesisus aja jooksul ja geneetiline mitmekesisus väheneb populatsiooni tabanud nn pudelikaelaefekti tõttu (Hartl & Clark 1997). „Pudelikaelad“ on põhjustatud erinevatest populatsiooni ajaloos toimunud sündmustest, näiteks migratsioonist, populatsiooni üksikute isendite poolt kaugemate alade koloniseerimisest või eelmises peatükis mainitud elupaiga fragmenteerumisest. Teatakse, et ajalooliselt katkematud refuugiumid, kus on püsinud sobivad tingimused kliimamuutuste (nt jääaegade) üleelamiseks, on geneetiliselt mitmekesisemad kui äsja koloniseeritud alad (Hewitt 1999). Seega aitab geneetilise mitmekesisuse võrdlemine liikide levikualal eristada vanu, algseid asustusalasid värskest asustatud aladest. Teatud haplotüüpide geograafiline levik võib anda lisateavet liigi levikuteede kindlaks tegemiseks (Printzen *et al.* 2013).

Uuringust selgus, et kõige suurem *Cetraria aculeata* mükobiondi ja fotobiondi populatsioonide nukleotiidne mitmekesisus (ITS järjestuste põhjal) oli Arktikas ja see vähenes Antarktika suunas. Siit võib järeldada, et *Cetraria aculeata* rühm on tekkinud põhjapoolkeral ja sealt edasi koloniseerinud juba lõunapoolkera. Antarktika populatsioonid on geneetiliselt peaaegu ühetaolised, mis viitab antud mandril ühekordse kolonisatsioonisündmuse toimumisele. Geneetilise materjali vahetus Lõuna-Ameerika lõunapoolseima tipu mitmekesisemate populatsioonidega on pigem ebatõenäoline. Fotobiondi populatsioonide puhul oli erandlik levila vahemereline piirkond, mis oli mükobiondi populatsioonidega võrreldes geneetiliselt mitmekesisem (Printzen *et al.* 2013).

Arvatakse, et polaar- ja parasvöötmebioomides esinevad *Cetraria aculeata* rühma geneetiliselt erinevad isendid on kohastunud kohalike keskkonnatingimustega. Mükobiondi ristumine kohaliku adapteerunud fotobiondiga annab võimaluse samblikul *Cetraria aculeata* koloniseerida ökoloogiliselt väga erinevaid bioome. Samas ei ole tõendeid, et samblikud vahetaks fotobionti kiirelt ja korduvalt, sest samblikku moodustavat seent *Cetraria aculeata* peetakse asekuaalseks liigiks, mis paljuneb valdavalt mõlemat sümbionti sisaldavate tallusetükkide abil. Ent kiire sümbiondi vahetus võimaldaks mükobiondil võrreldes aeglaste evolutsiooniliste protsessidega (mutatsioonid, selektsioon) kiiremini reageerida keskkonnatingimuste muutustele. Kuna polaaralade populatsioonid ja parasvöötmealade populatsioonid on geneetiliselt omavahel eraldatud, siis on populatsioonide minevikus tõenäoliselt toimunud fotobiondi vahetus võimaldanud samblikku moodustaval seenel *Cetraria aculeata* asustada niivõrd laia ökoloogilist nišši (Printzen *et al.* 2013).

Enamik samblikest asustavad palju suuremaid alasid kui soontaimed. Mandritevaheline levik on tavaline, seda enam, et samblike levised on kõrgemate taimede seemnetest suurusjärgu võrra väiksemad, võimaldades pika vahemaa taha levimist. Samblike levised on kas suguliselt toodetud seeneeosed, mis peavad uues kohas relihheniseerumiseks leidma sobiva fotobiondi või vegetatiivse tekkega soreedid, isiidid ja talluse fragmendid, kus fotobiont ja mükobiont levivad koos (Rolstad *et al.* 2013).

Rolstad *et al.* (2013) uurisid kahe liigi, pika lõhnasambliku (*Evernia divaricata* [L.] Ach.) ja hiid-habesambliku (*Usnea longissima* Ach.), geneetilise mitmekesisuse näitajate ja paljunemisviisi vahelisi seoseid. Põhja-Euroopas on mõlemad liigid enamikes riikides ohustatud, kuid Põhja-Ameerikas üsna laialt levinud ja elujõulised. Leiti, et *Evernia divaricata* ja *Usnea longissima* populatsioonid olid Skandinaavias geneetiliselt väga vähe

varieeruvad võrreldes Põhja-Ameerika populatsioonidega. Seda kinnitavad ka varasemad uuringud, et Kesk- ja Põhja-Euroopa populatsioonid on geneetiliselt vaesunud ja Põhja-Ameerikas asuvad geneetilised rikkad populatsioonid (Printzen *et al.* 2003; Walser *et al.* 2004, 2005). Samas on saadud ka teistsuguseid tulemusi, näiteks *Lobaria pulmonaria* Norra populatsioonid (Hilmo *et al.* 2012) on osutunud võrdselt varieeruvateks Kanada populatsioonidega Briti Kolumbias (Walser *et al.* 2004). Tegelikult võrreldavate andmete saamiseks tuleks aga kasutada kõigis uuringutes samu geneetilisi markereid, näiteks mikrosatelliite, mis on palju enam varieeruvamad kui *Cetraria aculeata*, *Evernia divaricata* ja *Usnea longissima* uuringutes (Printzen *et al.* 2003; Rolstad *et al.* 2013) kasutatud ITS ning IGS järjestused.

Veel leiti (Rolstad *et al.* 2013), et *Evernia divaricata* Skandinaavia genotüübid olid selle piirkonna jaoks unikaalsed, vastupidiselt *Usnea longissima* Skandinaavia genotüüpidele, mis olid laialt levinud ka Põhja-Ameerikas. *Evernia divaricata* Skandinaavia haplotüübid olid 3–4 mutatsioonisammu kaugusel lähimast sarnasest Põhja-Ameerika haplotüübist, samal ajal kui *Usnea longissima* Skandinaavia haplotüübid olid ainult ühe mutatsioonisammu kaugusel lähimast sarnasest Põhja-Ameerika haplotüübist. Siit võib järeldada, et erinevalt liigist *Usnea longissima*, *Evernia divaricata* tõenäoliselt ei levinud Põhja-Ameerikast Euroopasse, mida kinnitab ka mandritevaheliste lähimate populatsioonide vaheline kaugus, vastavalt 4000 km ja 9000 km.

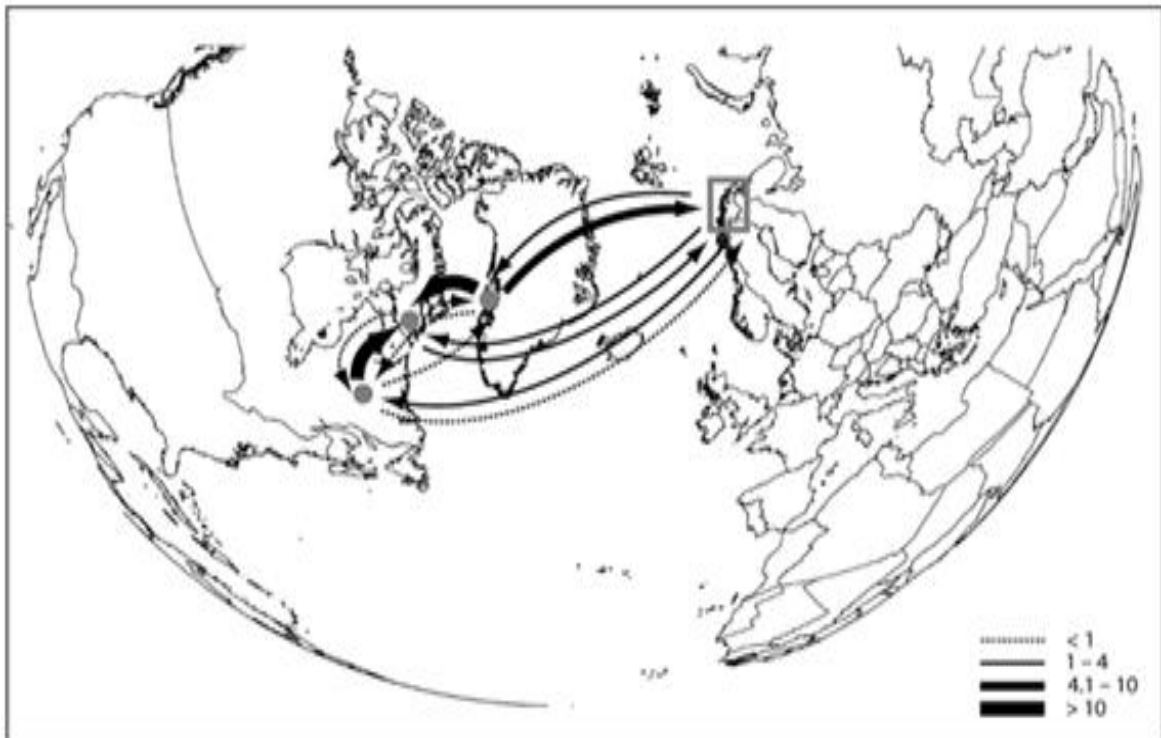
Varem on eeldatud, et populatsioonisisene geneetiline varieeruvus on eeltingimus sugulise paljunemise toimumiseks (Zoller *et al.* 1999). See arvamus põhines korrelatsioonil, et *Lobaria pulmonaria* geneetiliselt mitmekesised populatsioonid on fertiilsemad kui vähem varieeruvad populatsioonid. Nii nagu ühes varasemas (Walser *et al.* 2004) uuringus, ei leitud ka hiljutises töös (Rolstad *et al.* 2013) samblike populatsioonide geneetilise varieeruvuse ja fertiilsuse vahel korrelatsiooni. Siiski leiti *Evernia divaricata* populatsiooni suuruse ja fertiilsuse vahel positiivne suhe. Fertiilsus võib peegeldada hoopis elupaiga kvaliteeti, sest kvaliteetsetes elupaikades on tavaliselt suuremad populatsioonid. *Usnea longissima* puhul sellist suhet ei leitud (Rolstad *et al.* 2013).

Kui varasemalt arvati (Printzen *et al.* 2003; Walser *et al.* 2005), et katkendliku levikualaga populatsioonid on tugevalt mõjutatud mineviku kliimamuutustest, siis nüüd peetakse oluliseks uurida ka ulatusliku levilaga samblikke, mida populatsiooni ajaloos toiminud sündmused pole tugevalt mõjutanud. Vastavalt põhjapoolkera boreaal- ja polaaralade vegetatsiooniajaloole on tõenäoline, et sealse tsirkumpolaarselt levinud liigi

Porpidia flavicunda (Ach.) Gowan levikumuster on viimaste aastatuhandete jooksul jäänud valdavalt samaks, sõltumata esinenud jääajast. Seega eristub see liik vahemerelistest ja parasvöötme liikidest, mille levikut on tugevalt mõjutanud minevikus toimunud kliimamuutused (Buschbom 2007). Seega peaks Põhja-Ameerika ja Euroopa *Porpidia flavicunda* populatsioonide DNA järjestuste mitmekesisus peegeldama populatsioonide geograafilist eristumist ja tänapäevast geenivoolutaset.

Porpidia flavicunda geneetilist struktuuri iseloomustab viis geneetiliselt eristunud liini, mis võivad olla tekkinud eelnevatel jäävaheaegadel populatsiooni tabanud „pudelikaeltest“. Buschbom (2007) leidis, et vaadeldud mandrite vahel ja siseselt on *Porpidia flavicunda* identsete haplotüüpide levik lai ja fikseerunud nukleotiidi polümorfismid puuduvad, mis võib olla põhjustatud viimasel jääajal toimunud populatsiooni homogeniseerumisest läbi migratsiooni ja rekombinatsiooni. Põhja-Ameerikas uuritud kolmes piirkonnas oli populatsioonide geneetiline mitmekesisus erinev – esines nii geneetiliselt mitmekesisemaid kui ka keskmise ja vähese mitmekesisusega piirkondi. Euroopa populatsioonide geneetiline mitmekesisus oli keskmine. Sellest tulenevalt võib väita, et Põhja-Ameerikas ja Euroopas ei ole populatsioonid geneetiliselt täielikult isoleeritud. Võrreldes eelpool mainitud uuringutega (Printzen *et al.* 2003; Rolstad *et al.* 2013; Walser *et al.* 2004, 2005), ei leitud *Porpidia flavicunda* Euroopa populatsioonides nn pudelikaelaefektist tingitud geneetilise mitmekesisuse ammendumist. Haplotüüpide levikumustri järgi toimub nii mandrite vahel kui siseselt tugev, kuid asümmeetriline geenivool Gröönimaalt ja Kanada maismaaosalt Baffini saarele ja vastupidi, samuti Gröönimaalt Euroopasse (Joonis 7).

Migratsioonitasemest Põhja-Ameerika ja Euroopa vahel võib järeldada, et geograafiliste alade vahel vahetatakse piisavalt suur hulk migrante, et säästa populatsiooni geenitriivist põhjustatud drastilisest geneetilisest eristumisest. Haplotüüpide leviku- ja migratsioonimuster viitab sellele, et üksteisele geograafiliselt lähemad populatsioonid on geneetiliselt sarnasemad kui geograafiliselt kaugemal paiknevad populatsioonid (Buschbom 2007).



Joonis 7. Liigi *Porpidia flavicunda* uuritud populatsioonid ja migrantide arv populatsioonide vahel generatsiooni kohta. Migratsiooni ulatus on jagatud nelja klassi (<1 migranti, 1–4 migranti, 4,1–10 migranti, >10 migranti generatsiooni kohta) ja seda jaotust peegeldab noolte paksus. Uuritud alad läänest itta: Québec, Baffini saar, Gröönimaa, Euroopa (Buschbom 2007 järgi).

5. Arutelu

Samblike sümbiontsest iseloomust tingituna sisaldab samblikutallus, erinevalt enamikust teistest organismidest, vähemalt kahe eri organismi DNA-d. Eri organismide geneetiline materjal talluses võib aga raskendada populatsioonigeneetilist analüüsi, sest näiteks universaalsed molekulaarsed meetodid on väga tundlikud ja mittevajaliku DNA juuresolek proovis võib tulemusi moonutada (Werth 2010). Võõr-DNA segavast mõjust hoidumiseks võib sambliku mõlemale sümbiondile spetsiifilised mikrosatelliitide praimerid disainida, kuid siiani on samblike populatsioonigeneetikat uuritud põhiliselt ainult mükobiondi kaudu, ning mükobiondi ja fotobiondi populatsioonigeneetikat on paralleelselt uuritud vaid mõnedes vähestes töödes (Mansournia *et al.* 2012; Werth *et al.* 2012).

Samblike populatsioonigeneetikas on kasutatud küllalt erinevaid meetodeid. Kui alguses prooviti populatsioonigeneetikat mõnel korral uurida samblikuainete keemilise varieeruvuse järgi (Culberson *et al.* 1988; Culberson *et al.* 1993), siis peagi selgus, et selline metoodika on edaspidiseks laialdaselt kasutusele võtmiseks liiga tülikas ning ajakulukas. Sel sajandil on samblike populatsioonigeneetikas kasutatud kiiremaid markereid, näiteks RAPD, AFLP, RFLP, ISSR, rDNA mittekodeerivaid lookusi, valke kodeerivaid lookusi ja mikrosatelliite (Tabel 1). Kõige suuremateks takistusteks eri meetodite juures on aga dominantsus (RAPD, AFLP, rDNA, ISSR) ja multilookuselisus (RFLP, rDNA), mis ei lase analüüsitulemusi õigesti tõlgendada, sest puudub võimalus uurida alleelide sõltumatut avaldumist. Ka homoplaasia esinemine (AFLP meetodi korral) on mõningaseks puuduseks (Meudt & Clarke 2007). Osad meetodid (RFLP ja AFLP) on teistest jällegi ajakulukamad, peamiselt vajadusest eeltötluseks restriктаasidega.

Kõige potentsiaalsemateks samblike populatsioonigeneetika töövahenditeks on osutunud mikrosatelliidid, olles kodominantsed, üksiklookuselised ja kiiresti kasutatavad markerid populatsioonigeneetilistes uuringutes (Werth *et al.* 2006). Kuid ka mikrosatelliitidel on omad puudused. Nimelt on mikrosatelliitide praimerite loomine aeganõudev ja suhteliselt kulukas töö ja siiani on neid disainitud vaid vähestele ja väga või suhteliselt kitsa levikuga liikidele (Sadowska-Des *et al.* 2013), mistõttu ei sobi need laiaks kasutuseks. Samblike populatsioonigeneetika arengule aitaks kindlasti kaasa see, kui edaspidi disainitaks mikrosatelliitide primereid ka laialt levinud ja tavaliste liikide jaoks.

Tabel 1. Populatsioonigeneetikas kasutatavate molekulaarsete meetodite võrdlus (Pénzes *et al.* 2002, Sadowska-Des *et al.* 2013, Semagn *et al.* 2006 ja Sunnucks 2000 järgi)

Molekulaarne meetod	PCR vajadus	Kodo-minantsus	Meetodi kiirus	Üksik-lookuselisus	Polümorfsuse tase	Hinnang
RFLP	–	+	aeglane (mitu päeva)	–	keskmine	Vajab suurt hulka DNA-d ja DNA eeltöötlemist restriктаasidega
RAPD	+	–	kiire (4–5 tundi)	+	kõrge	Mittespetsiifiline
AFLP	+	–	aeglane	+	väga kõrge	DNA vajab eeltöötlemist restriктаasidega, mittespetsiifiline
SSR ^a	+	+	kiire	+	kõrge	Kõige sobilikum populatsiooni-geneetilisteks uuringuteks
rDNA	+	+/-	kiire	+/- ^b	keskmine	Puuduseks lookuste omavaheline füüsiline seotus
Valke kodeerivad lookused	+	+	kiire	+	madal kuni kõrge	Universaalsete praimerite kasutamine problemaatiline
ISSR	+	–	kiire	–	kõrge	Puuduseks dominantsus, mittespetsiifiline

^ash mikrosatelliidid

^brDNA koosneb teatud regioonide tandeemsetest järjestustest. Osades taksonites on järjestused identsed ja regioonid käsitletakse üksiklookustena, kuid teistes taksonites võib olla eri indiviididel palju erinevaid järjestusi, mille korral käsitletakse rDNA-d kui multilookuselist süsteemi.

Eelmainitud meetoditega on võimalikud mitmesugused populatsiooniuringud. Näiteks saab uurida häiringualade ja katkenud levilaga populatsioonide geneetikat, ristumissüsteeme, liikide piire ja liikidevahelist erinevust ning populatsiooni struktuuri (Tabel 2). Lisaks saab samblike populatsioonigeneetilisi andmeid kasutada ka fülogeograafilistes uuringutes selgitamaks liikide migratsioonisuundi ja levialade muutumist ning nende seoseid selliste ajalooliste sündmustega nagu kliimaperioodide vaheldumine, jääaegade esinemine ja ulatus jms (Buschbom 2007; Printzen *et al.* 2013; Rolstad *et al.* 2013).

Tabel 2. Näiteid samblike populatsioonigeneetilistest uuringutest ja kasutatud meetoditest

Uurimisteema (laiemalt)	Uuritav liik/liigid	Kasutatud populatsioonigeneetiline meetod	Viide
Häiringualade või katkenud levilaga sambliku- populatsioonide geneetika	<i>Usnea filipendula</i>	RAPD	Heibel <i>et al.</i> (1999)
	<i>Biatora helvola</i>		Printzen <i>et al.</i> (1999)
	<i>Lobaria pulmonaria</i>	rDNA lookused (LSU, SSU, IGS, ITS), valku kodeerivad lookused (β -tubuliin ja histoon-3)	Zoller <i>et al.</i> (1999)
		Mikrosatelliidid	Hilmo <i>et al.</i> (2012); Jüriado <i>et al.</i> (2011); Otálora <i>et al.</i> (2011); Scheidegger <i>et al.</i> (2012); Werth <i>et al.</i> (2006)
Samblike ristumissüsteemid ja paljunemisviis	<i>Parmotrema tinctorum</i>	Mikrosatelliidid	Mansournia <i>et al.</i> (2012)
	<i>Cladonia floerkeana</i> , <i>Cladonia galindezii</i> , <i>Cladonia portentosa</i>	AFLP, RAPD	Seymour <i>et al.</i> (2005)
Liikide piiritlemine	<i>Cladonia chlorophaea</i> kogum	Samblikuainete analüüs kromatograafia (TLC, HPLC) abil	Culberson <i>et al.</i> (1988)
	<i>Ramalina siliquosa</i> kogum		Culberson <i>et al.</i> (1993)
	Perekond <i>Xanthoparmelia</i>	rDNA lookused (ITS, IGS, LSU, SSU-s paiknev grupp I intron), valku kodeerivad lookused (β -tubuliin ja MCM7)	Leavitt <i>et al.</i> (2011)
	Perekond <i>Lobothallia</i>	RAPD, ISSR	Yüzbaşıoğlu <i>et al.</i> (2011)
Populatsiooni struktuur	<i>Thamnolia subuliformis</i>	ISSR, RLFP, rDNA lookused (SSU, ITS)	Cassie (2006)
	<i>Cladonia arbuscula</i>	rDNA lookused (SSU, ITS), RLFP	Kotelko <i>et al.</i> (2008)
Fülogeograafilised uuringud	<i>Porpidia flavicunda</i>	rDNA lookus (LSU), valku kodeerivad lookused (β -tubuliin, RPB2)	Buschbom (2007)
	<i>Cetraria aculeata</i>	rDNA lookused (ITS, LSU), valku kodeeriv lookus (GPD)	Printzen <i>et al.</i> (2013)
	<i>Evernia divaricata</i> <i>Usnea longissima</i>	rDNA lookused (ITS, IGS)	Rolstad <i>et al.</i> (2013)

Eri meetoditega saadud tulemused on sageli erisugused. Näiteks Põhja-Ameerika ja Euroopa erinevate liikide samblikupopulatsioonide võrdluses on mitmel korral leitud, et Põhja-Ameerikas on geneetiliselt varieeruvamad populatsioonid kui Euroopas (Printzen *et al.* 2003; Rolstad *et al.* 2013; Walser *et al.* 2004, 2005), kuid samade mandrite vahel on leitud ka võrdselt varieeruvaid populatsioone (Hilmo *et al.* 2012). Samas peab arvestama, et tegemist on erinevate liikide kohta tehtud uuringutega, mis ei peagi alati samu tulemusi näitama. Võrreldavate tulemuste saamiseks peaks kasutama sama metoodikat, näiteks juba eespool välja pakutud mikrosatelliite. Praegu takistab, nagu eespool mainitud, mikrosatelliitide laiemat kasutamist vastavate spetsiifiliste praimerite vähesus.

Ka *Lobaria pulmonaria* uuringute looduskaitseteemalised soovitusel lähivad tihti eri autorite vahel vastuollu. Kui näiteks ühes töös soovitatakse sobimatute või vähetähtsate peremeespuude valikraiet, et suurendada peremeespuu levikut (Werth *et al.* 2006), siis teises töös leitakse, et juba tagasihoidlik raie metsas vähendab sambliku populatsioonide geneetilist mitmekesisust (Scheidegger *et al.* 2012). Samas on mitu autorit ühel nõul, et samblike geneetilise mitmekesisuse ja populatsiooni suuruse säilitamiseks tuleb tagada vanade metsade säilimine (Hilmo *et al.* 2012; Otálora *et al.* 2011) ja mitmekesine puistustruktuur ning peremeespuude olemasolu vanade puude naabruses, et võimaldada elupaikade sidusust (Jüriado *et al.* 2011; Scheidegger *et al.* 2012). Mõlemal juhul, nii eri meetodite tulemuste kui ka looduskaitseteemaliste soovitude vasturääkivuste lahendamiseks oleks ilmselt kasu sellest, kui kaasata uuringutesse võimalikult palju erinevaid liike ja piirkondi.

Tulevikus on populatsioonigeneetilistel uuringutel samblike bioloogias oluline osa siiani veel suuresti uurimata samblike leviku-, ristumis- ja geenimustrite välja selgitamisel, mis annavad vihjeid samblike sugulussidemetest, aga ka osade liikide ohustatusest ning võivad seeläbi kaasa aidata näiteks ohustatud samblike kaitsemeetmete koostamisele või siis samblikku moodustavate seeneliikide põhjendatud piiritlemisele.

Kokkuvõte

Populatsioonigeneetilised uuringud annavad väärtuslikku informatsiooni populatsiooni geneetilise tausta kohta. Teades populatsioonide geenimustreid, on võimalik saada rohkem teada populatsioonide ajaloost, iseloomust ja populatsiooni mõjutanud sündmustest.

Töös käsitleti esiteks ülevaatlikult samblike populatsioonigeneetikas kasutatavaid meetodeid. Sel sajandil on samblike populatsioonigeneetikas kasutatud kiireid molekulaarseid markereid, näiteks universaalsete sõrmejälgede meetodeid (RAPD ja AFLP), RFLP, ISSR, rDNA mittekodeerivaid lookusi, valke kodeerivaid lookusi ja mikrosatelliite. Suurimateks takistusteks eri meetodite juures on dominantsus (RAPD, AFLP, rDNA, ISSR) ja multilookuselisus (RFLP, rDNA), mis ei lase analüüsitulemusi õigesti tõlgendada, sest puudub võimalus uurida alleelide sõltumatut avaldumist. Ka homoplaasia esinemine (AFLP meetodi korral) on mõningaseks puuduseks. Osad meetodid (RFLP ja AFLP) on teistest jällegi ajakulukamad, peamiselt vajadusest eeltöödelda DNA-d restriктаasidega. Samblike sümbiontsest iseloomust tingituna on kõige paljulubavamaks populatsioonigeneetiliseks meetodiks populatsiooni tasemel kõrget polümorfismi taset näidanud mikrosatelliidid. Praegu takistab mikrosatelliitide laialdasemat kasutuselevõttu sümbiondispetsiifiliste praimerite vähesus.

Üks väheseid samblikku moodustavaid seeni, mille jaoks on mikrosatelliitide praimereid disainitud nii müko- kui fotobiondile, on harilik kopsusamblik (*Lobaria pulmonaria*). Selle sambliku näitel vaadeldi erinevaid tegureid, mis mõjutavad samblike geneetilist mitmekesisust, näiteks looduslikke ja inimtekkelisi häiringuid, elupaiga fragmenteerumist ja kasvukoha kvaliteeti. Selgus, et viimane nimetatutest avaldab tõenäoliselt samblike geneetilisele mitmekesisusele kõige suuremat mõju. Samblike geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks on välja pakutud mitmeid looduskaitse sisuga soovitusi, mis aga eri autorite puhul osutusid mõnel korral vastuolulisteks.

Populatsioonigeneetilisi meetodeid on kasutatud ka muudes valdkondades, nagu ristumissüsteeme, liikide piiritlemist ja populatsiooni struktuuri käsitlevates töodes ning fülogeograafilistes uuringutes. Senised fülogeograafilised uurimused on mõne liigi kohta näidanud, et Põhja-Ameerika populatsioonid on geneetiliselt varieeruvamad kui Euroopa populatsioonid, kuid üldistuste tegemiseks on andmeid veel liiga vähe. Sisukamate tulemuste saavutamiseks on edaspidi oluline uurida rohkem mitmesuguseid, ka laiemalt levikuga liike, ning ühe liigi populatsioone eri piirkondadest.

Genetic variation of lichen populations

Summary

Population genetic studies give valuable information about genetic background of the population. Knowing the genetic patterns of populations, it is possible to give a great insight into population history, nature and events that have affected population.

In this paper population genetic methods of lichens were discussed. Within this century, rapid molecular markers, for example universal fingerprints techniques (RAPD and AFLP), RFLP, ISSR, rDNA non-coding loci, protein-coding loci and microsatellites, have been used in population genetic studies of lichens. The biggest complications of different methods are dominant inheritance of loci (RAPD, AFLP, rDNA, ISSR) and occurrence of multilocus system, which make impossible to identify appearance of independent alleles, and hence to draw correct conclusions. Also homoplasy is sometimes an issue (AFLP). Some methods (RFLP and AFLP) are more time-consuming, mainly due to the need to preprocess DNA with restriction enzymes, compared to others. Because of symbiotic nature of lichens, microsatellites, which have demonstrated high levels of polymorphism at population level, are the most promising genetic markers for population studies. Widespread use of microsatellites is currently prevented, because of paucity of symbiont-specific primers.

Lobaria pulmonaria is one of the few lichen-forming fungi, for which primers have been designed for both symbionts – for the mycobiont and the photobiont. The aspects that affect genetic diversity of lichens, for example natural and human-caused disturbances, fragmentation and quality of habitats, were observed based on studies of *Lobaria pulmonaria*. It appeared that the quality of habitats had the biggest influence on genetic diversity of lichens. To preserve genetic diversity of lichens, different authors have proposed several conservation suggestions, which appeared controversial in some cases.

Population genetic methods have also been used in some other fields, for example in studies dealing with breeding systems, species delimitation, population structure and phylogeography. So far, phylogeographical studies have shown that North American populations of some species contain very high levels of genetic variation compared with Europe, however, there is too little information yet to make comprehensive generalisations. Therefore, in further studies it is important to explore more diverse and widely distributed lichens, and populations of certain species in different regions.

Tänuõnad

Täna oma juhendajat Tiina Randlast väärtuslike nõuannete ja igakülgse abi eest.

Kasutatud kirjandus

- Bailey, R. H., 1976. Ecological aspects of dispersal and establishment in lichens. In *Lichenology: Progress and problems* (eds. Brown, D. H., Hawksworth, D. L. & Bailey, R. H.). London: Academic Press. 215–247 pp.
- Brodo, I. M., 1986. Interpreting chemical variation in lichens for systematic purposes. *The Bryologist* **89**: 132–138.
- Buschbom, J., 2007. Migration between continents: geographical structure and long-distance gene flow in *Porpidia flavicunda* (lichen-forming *Ascomycota*). *Molecular Ecology* **16**: 1835–1846.
- Culberson, C. F., Culberson, W. L. & Johnson, A., 1988. Gene flow in lichens. *American Journal of Botany* **75**: 1135–1139.
- Culberson, W. L., Culberson, C. F. & Johnson, A., 1993. Speciation in lichens of the *Ramalina siliquosa* complex (*Ascomycotina*, *Ramalinaceae*): Gene flow and reproductive isolation. *American Journal of Botany* **80**: 1472–1481.
- Dal Grande, F., Beck, A., Singh, G. & Schmitt, I., 2013. Microsatellite primers in the lichen symbiotic alga *Trebouxia decolorans* (*Trebouxiophyceae*). *Applications in Plant Sciences* **1**: 1200400.
- Dal Grande, F., Widmer, I., Beck, A. & Scheidegger, C., 2010. Microsatellite markers for *Dictyochloropsis reticulata* (*Trebouxiophyceae*), the symbiotic alga of the lichen *Lobaria pulmonaria* (L.). *Conservation Genetics* **11**: 1147–1149.
- Edman, M., Eriksson, A.-M. & Villard, M.-A., 2008. Effects of selection cutting on the abundance and fertility of indicator lichen *Lobaria pulmonaria* and *Lobaria quercizans*. *Journal of Applied Ecology* **45**: 26–33.
- Ellstrand, N. C. & Elam, D. R., 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 217–242.

- Fahrig, L., 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**: 487–515.
- González-Astorga, J., Cruz-Angón, A., Flores-Palacios, A. & Vovides, A. P., 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* **94**: 545–551.
- Hartl, D. L. & Clark A. G., 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. 542 pp.
- Heibel, E., Lumbsch, H. T. & Schmitt, I., 1999. Genetic variation of *Usnea filipendula* (Parmeliaceae) populations in western Germany investigated by RAPDs suggests reinvasion from various sources. *American Journal of Botany* **86**: 753–757.
- Hewitt, G. M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87–112.
- Hilmo, O., Lundemo, S., Holien, H., Stengrundet, K. & Stenøien, H. K., 2012. Genetic structure in a fragmented Northern Hemisphere rainforest: large effective sizes and high connectivity among populations of epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria*. *Molecular Ecology* **21**: 3250–3265.
- James, E. A. & Ashburner, G. R., 1997. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae) and implications for the conservation of this Australian species. *Biological Conservation* **82**: 253–261.
- Jones, T. C., Green, T. G. A., Hogg, I. D. & Wilkins, R. J., 2012. Isolation and characterization of microsatellites in the lichen *Buellia frigida* (Physciaceae), an Antarctic endemic. *American Journal of Botany* **99**: 131–133.
- Jüriado, I., Liira, J., Csencsics, D., Widmer, I., Adolf, C., Kohv, K. & Scheidegger, C., 2011. Dispersal ecology of the endangered woodland lichen *Lobaria pulmonaria* in managed hemiboreal forest landscape. *Biodiversity and Conservation* **20**: 1803–1819.
- Kalwij, J. M., Wagner, H. H. & Scheidegger, C., 2005. Effects of stand-level disturbances on the spatial distribution of a lichen indicator. *Ecological Applications* **15**: 2015–2024.

- Kliman, R., Sheehy, B. & Schultz, J., 2008. Genetic drift and effective population size. *Nature Education* **1**: 3.
- Kotelko, R., Doering, M. & Piercey-Normore, M. D., 2008. Species diversity and genetic variation of terrestrial lichens and bryophytes in a boreal jack pine forest of central Canada. *The Bryologist* **111**: 594–606.
- Leavitt, S. D., Johnson, L. & St. Clair, L. L., 2011. Species delimitation and evolution in morphologically and chemically diverse communities of the lichen-forming genus *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) in western North America. *American Journal of Botany* **98**: 175–188.
- Magain, N., Forrest, L. L., Sérusiaux, E. & Goffinet, B., 2010. Microsatellite primers in the *Peltigera dolichorhiza* complex (lichenized ascomycete, *Peltigerales*). *American Journal of Botany* **97**: 102–104.
- Mansournia, M. R., Wu, B., Matsushita, N. & Hogetsu, T., 2012. Genotypic analysis of the foliose lichen *Parmotrema tinctorum* using microsatellite markers: association of mycobiont and photobiont, and their reproductive modes. *The Lichenologist* **44**: 419–440.
- Meudt, H. M. & Clarke, A. C., 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* **12**: 106–117.
- Otálora, M. G., Martínez, I., Belinchón, R., Widmer, I., Aragón, G., Escudero, A. & Scheidegger, C., 2011. Remnants fragments preserve genetic diversity of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in a fragmented Mediterranean mountain forest. *Biodiversity and Conservation* **20**: 1239–1254.
- Pénzes, Z., Csanádi, G., Kovács, G. M. & Beer, Z., 2002. Molecular markers in ecology. *Tiscia* **33**: 9–30.
- Peterson, E. B. & McCune, B., 2001. Diversity and succession of epiphytic macrolichen communities in low-elevation managed conifer forests in Western Oregon. *Journal of Vegetation Science* **12**: 511–524.
- Printzen, C., 2008. Uncharted terrain: the phylogeography of arctic and boreal lichens. *Plant Ecology & Diversity* **1**: 265–271.

- Printzen, C., Domaschke, S., Fernández-Mendoza, F. & Pérez-Ortega, S., 2013. Biogeography and ecology of *Cetraria aculeata*, a widely distributed lichen with a bipolar distribution. *MycoKeys* **6**: 33–53.
- Printzen, C., Ekman, S. & Tønsberg, T., 2003. Phylogeography of *Cavernularia hultenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Molecular Ecology* **12**: 1473–1486.
- Printzen, C., Lumbsch, H. T., Schmitt, I. & Feige, G. B., 1999. A study on the genetic variability of *Biatora helvola* using RAPD markers. *The Lichenologist* **31**: 491–499.
- Randlane, T. & Saag, A. (koost.), 2004. *Eesti pisisamblikud*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. 582 lk.
- Rolstad, J., Ekman, S., Andersen, H. L. & Rolstad, E., 2013. Genetic variation and reproductive mode in two epiphytic lichens of conservation concern: a transatlantic study of *Evernia divaricata* and *Usnea longissima*. *Botany* **91**: 69–81.
- Ronquist, F. & Sanmartín, I., 2011. Phylogenetic methods in biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **42**: 441–464.
- Sadowska-Deś, A. D., Bálint, M., Otte, J. & Schmitt, I., 2013. Assessing intraspecific diversity in a lichen-forming fungus and its green algal symbiont: Evaluation of eight molecular markers. *Fungal Ecology* **6**: 141–151.
- Scheidegger, C. & Goward, T., 2002. Monitoring lichens for conservation: Red Lists and conservation action plans. In: *Monitoring with lichens – monitoring lichens* (eds. Nimis, P. L., Scheidegger, C. & Wolseley, P. A.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 163–181 pp.
- Scheidegger, C., Bilovitz, P. O., Werth, S., Widmer, I. & Mayrhofer, H., 2012. Hitchhiking with forests: population genetics of epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* in primeval and managed forests in southeastern Europe. *Ecology and Evolution* **2**: 2223–2240.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
109: 6241–6246.

- Schulten, J. A., 1985. The effects of burning on the soil lichen community of a sand prairie. *The Bryologist* **88**: 110–114.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**: 615–629.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å. & Ndjiondjop, M. N., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* **5**: 2540–2568.
- Seymour, F. A., Crittenden, P. D., Dickinson, M. J., Paoletti, M., Montiel, D., Cho, L. & Dyer, P. S., 2005. Breeding systems in the lichen-forming fungal genus *Cladonia*. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 554–563.
- Spribille, T., Klug, B. & Mayrhofer, H., 2011. A phylogenetic analysis of the boreal lichen *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, lichenized Ascomycota) reveals cryptic clades correlated with fatty acid profiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**: 603–614.
- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 199–203.
- Zoller, S., Lutzoni, F. & Scheidegger, C., 1999. Genetic variation within and among populations of the threatened lichen *Lobaria pulmonaria* in Switzerland and implications for conservation. *Molecular Ecology* **8**: 2049–2059.
- Tautz, D. & Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**: 4127–4138.
- Trapnell, D. W. & Hamrick, J. L., 2005. Mating patterns and gene flow in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* **14**: 75–84.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. *et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407–4414.
- Walser, J.-C., Gugerli, F., Holderegger, R., Kuonen, D. & Scheidegger, C., 2004. Recombination and clonal propagation in different populations of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Heredity* **93**: 322–329.

- Walser, J.-C., Holderegger, R., Gugerli, F., Hoebee, S. E. & Scheidegger, C., 2005. Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Molecular Ecology* **14**: 457–467.
- Walser, J.-C., Sperisen, C., Soliva, M. & Scheidegger, C., 2003. Fungus-specific microsatellite primers of lichens: application for the assessment of genetic variation on different spatial scales in *Lobaria pulmonaria*. *Fungal Genetics and Biology* **40**: 72–82.
- Werth, S. & Scheidegger, C., 2012. Congruent genetic structure in the lichen-forming fungus *Lobaria pulmonaria* and its green-algal photobiont. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 220–230.
- Werth, S., 2010. Population genetics of lichen-forming fungi – a review. *The Lichenologist* **42**: 499–519.
- Werth, S., Wagner, H. H., Holderegger, R., Kalwij, M. & Scheidegger, C., 2006. Effect of disturbances on the genetic diversity of an old-forest associated lichen. *Molecular Ecology* **15**: 911–921.
- Widmer, I., Dal Grande, F., Cornejo, C. & Scheidegger, C., 2010. Highly variable microsatellite markers for the fungal and algal symbionts of the lichen *Lobaria pulmonaria* and challenges in developing biont-specific molecular markers for fungal associations. *Fungal Biology* **114**: 538–544.
- Wirtz, N., Printzen, C. & Lumbsch, H. T., 2012. Using haplotype networks, estimation of gene flow and phenotypic characters to understand species delimitation in fungi of a predominantly Antarctic *Usnea* group (Ascomycota, Parmeliaceae). *Organisms Diversity & Evolution* **12**: 17–37.
- Öckinger, E. & Nilsson, S. G., 2010. Local population extinction and vitality of an epiphytic lichen in fragmented old-growth forest. *Ecology* **91**: 2100–2109.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 413–418.
- Yüzbaşıoğlu, E., Halıcı, M. G., Karabacak, M. & Aksoy, A., 2011. RAPD and ISSR markers indicate high genetic variation within *Lobothallia radiosia* in Turkey. *Mycological Progress* **10**: 219–228.

Internetileheküljed

Cassie, D. M., 2006. The population structure of *Thamnolia subuliformis* and *Dicranum elongatum* in northeastern coastal regions of Wapusk National Park, Manitoba.

Master Thesis. University of Manitoba.

[<http://mspace.lib.umanitoba.ca/handle/1993/301>] 14.11.2013.

Consortium of North American Lichen Herbaria.

[<http://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=54568>] 11.03.2014.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anna-Liisa Kuusmik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Samblikupopulatsioonide geneetiline varieeruvus, mille juhendaja on Tiina Randlane

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2014**